

Maciej Dawidowski

Autoreferat

Załącznik nr 2



Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Styczeń 2015

1. Imię i nazwisko.

Maciej Dawidowski

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.

Dyplom doktora nauk farmaceutycznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, rok 2010.
Tytuł pracy: „Synteza, struktura oraz potencjalne właściwości przeciwdrgawkowe nowych, chiralnych pochodnych 2,6-diketopiperazyny”, praca wyróżniona (*summa cum laude*)

Dyplom magistra farmacji, Akademia Medyczna w Warszawie, rok 2005, dyplom z wyróżnieniem.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .

04.2013 – obecnie Naukowiec, Institute of Structural Biology, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt oraz Lehrstuhl für Biomolekular NMR Spektroskopie, Department Chemie, Technische Universität München

09.2010 - obecnie Adiunkt, Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej , Warszawski Uniwersytet Medyczny

08.2005-09.2010 Asystent, Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej , Warszawski Uniwersytet Medyczny

4. Osiągnięcie stanowiące podstawę habilitacji – wynikające z art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.u. nr 65, poz. 595, z późn. zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

„Zastosowanie wielokomponentowej reakcji Ugi jako kluczowego etapu syntezy nowych pochodnych 2,6-diketopiperazyny o wysokiej aktywności przeciwdrgawkowej w zwierzęcych modelach epilepsji”

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl 6 publikacji powiązanych tematycznie. Zostały one opublikowane w latach 2012-2014 w czasopismach zagranicznych o sumarycznym współczynniku **IF 12,724** oraz łącznej punktacji **MNiSW 145 pkt.** We wszystkich tych publikacjach jestem autorem pierwszym, korespondującym.

b) Wykaz publikacji

- H-1. **M. Dawidowski**, F. Herold, J. Turło, M. Wilczek, A. Chodkowski, A. Gomółka, J. Kleps *Synthesis of Bicyclic 2,6-Diketopiperazines via a Three-Step Sequence Involving an Ugi Five-Center, Four-Component Reaction* **Tetrahedron** 68, (2012), 8222-8230; **IF₂₀₁₂=2.803; 30 pkt. MNiSW**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji i koordynowaniu badań, otrzymaniu większości związków, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- H-2. **M. Dawidowski**, M. Wilczek, K. Kubica, M. Skolmowski, J. Turło *Structure–activity relationships of the aromatic site in novel anticonvulsant pyrrolo[1,2-a]pyrazine derivatives* **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 23, (2013), 6106–6110; **IF₂₀₁₃=2.331, 25 pkt. MNiSW**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji i koordynowaniu badań, zaprojektowaniu nowych związków i otrzymaniu większości z nich, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- H-3. **M. Dawidowski**, J. Choińska, W. Mika, J. Turło *Novel fluorinated pyrrolo[1,2-a]pyrazine-2,6-dione derivatives: Synthesis and anticonvulsant evaluation in animal models of epilepsy* **Bioorg. Med. Chem.** 22, (2014), 5410–5427; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.042>; **IF₂₀₁₃=2.951, 30 pkt. MNiSW**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji i koordynowaniu badań, zaprojektowaniu nowych związków i otrzymaniu większości z nich,

interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

- H-4. **M. Dawidowski, J. Turło** *Multicomponent synthesis and anticonvulsant activity of monocyclic 2,6-diketopiperazine derivatives* **Med. Chem. Res.** 23, (2014), 2007–2018; <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-013-0800-4>; **IF₂₀₁₃=0, 0 pkt. MNiSW***

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji i koordynowaniu badań, zaprojektowaniu i otrzymaniu wszystkich związków, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

- H-5. **M. Dawidowski, S. Sobczak, M. Wilczek, A. Kulesza, J. Turło** *Expanding the substrate scope of Ugi five-center, four-component reaction (U-5C-4CR): ketones as coupling partners for secondary amino acids* **Mol. Divers.** 18, (2014), 61–77; <http://dx.doi.org/10.1007/s11030-013-9488-0>; **IF₂₀₁₃=2.544, 30 pkt. MNiSW**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji i koordynowaniu badań, otrzymaniu większości związków, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

- H-6. **M. Dawidowski, W. Lewandowski, J. Turło** *Synthesis of new perhydropyrrolo[1,2-a]pyrazine derivatives and their evaluation in animal models of epilepsy* **Molecules** 19, (2014), 15955-15981; doi:10.3390/molecules191015955; **IF₂₀₁₃=2.095, 30 pkt. MNiSW**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji i koordynowaniu badań, zaprojektowaniu nowych związków i otrzymaniu większości z nich, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

c) Omówienie celu naukowego i wyników badań cyklu wyżej wymienionych prac.

Wprowadzenie

Przedstawiony cykl prac badawczych obejmuje zagadnienia chemii medycznej (*medicinal chemistry*), czyli gałęzi nauk farmaceutycznych zajmującej się projektowaniem oraz otrzymaniem nowych związków chemicznych jako aktywnych składników leku. W dużym

* Decyzją Thomson Reuters współczynnik IF dla tego czasopisma za rok 2013 nie został wyznaczony. Ostatni wyznaczony współczynnik Impact Factor: **IF₂₀₁₂=1.612, 20 pkt. MNiSW.**

uproszczeniu badania takie polegają na powtarzających się cyklach projektowania, syntezy oraz badania aktywności związków chemicznych (np. na izolowanych białkach, ich kompleksach, szlakach biochemicznych czy wreszcie żywych organizmach), przy czym do każdego kolejnego cyklu kwalifikuje się najczęściej substancje o korzystniejszych właściwościach względem związków wyjściowych, na podstawie określenia zależności struktura-aktywność. Chemia medyczna jest gałęzią multidyscyplinarną, obejmującą m.in. zagadnienia z zakresu chemii organicznej, biochemii, biologii strukturalnej, farmakologii oraz farmakokinetyki [1,2]. Prace badawcze przedstawione do oceny obejmują w szczególności optymalizację struktury potencjalnego nowego leku metodami klasycznej chemii medycznej (a więc taką, w której nie znane są molekularne podstawy efektu biologicznego wywołanego przez substancję), analizę zależności struktura-aktywność, syntezę organiczną w oparciu o reakcje wielokomponentowe oraz stereochemię.

Epilepsja jako wyzwanie terapeutyczne

Padaczka (epilepsja) to zaburzenie funkcji mózgu przejawiające się stałą predyspozycją do generowania napadów padaczkowych i powodowania związanych z tym konsekwencji neurobiologicznych, kognitywnych, psychologicznych i społecznych [3]. Padaczka jest powszechnie występującym schorzeniem. Cierpi na nią około 50 milionów ludzi na świecie, a wśród zaburzeń neurologicznych znajduje się ona na trzecim miejscu co do liczby zachorowań. Szacuje się, że 4-5 % ludzi na świecie doświadczyło w swoim życiu przynajmniej jednego napadu [4].

Podstawowym celem postępowania terapeutycznego w padaczce jest niedopuszczenie do wystąpienia napadu, który często stwarza niebezpieczeństwo poważnych obrażeń ciała [5]. Jako że epilepsja jest chorobą bardzo niejednorodną zarówno pod względem etiologii jak i objawów, w farmakoterapii stosuje się wiele leków przeciwpadaczkowych o różnorodnych mechanizmach działania. Wiele z nich zostało wprowadzonych w latach 1910-1970. Są to preparaty określane jako "pierwszej generacji" (takie jak *Klonazepam*, *Fenobarbital*, *Etosuksimid*, *Karbamazepina*) a ich cechami wspólnymi są umiarkowana skuteczność kliniczna oraz, w większości przypadków, niekorzystny profil bezpieczeństwa stosowania. W przeciągu następnych 20 lat pojawiło się wiele nowszych leków tzw. „drugiej generacji” (m.in. *Wigabatryna*, *Gabapentyna*, *Felbamat*, *Lamotrygina*, *Tiagabina*, *Topiramet*). Najnowsze leki, w tym preparaty znajdujące się w fazach klinicznych i przedklinicznych

określa się jako „leki trzeciej generacji” (takie jak np. *Eslikarbazepina*, *Lacosamid*, *Retigabina*) [6,7].

Z uwagi na przewlekły charakter choroby, jej bardzo poważne konsekwencje zdrowotne, społeczne oraz psychologiczne, farmakoterapia powinna umożliwiać pacjentowi normalne funkcjonowanie w społeczeństwie i podnosić komfort jego życia. Idealnym wynikiem leczenia byłby więc brak napadów i brak działań niepożądanych [5]. O ile większość nowszych preparatów cechuje się lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi i mniejszą ilością działań niepożądanych oraz interakcji w porównaniu do leków klasycznych, to objęły one swym zakresem terapeutycznym zaledwie 15-20% przypadków padaczki odpornej na leczenie lekami pierwszej generacji a lekooporność dotyczy nadal aż 30% pacjentów. Istnieje więc ważna przesłanka do intensywnych badań nad otrzymaniem nowych aktywnych substancji o wyższej skuteczności w przypadkach padaczki lekoopornej [7-10].

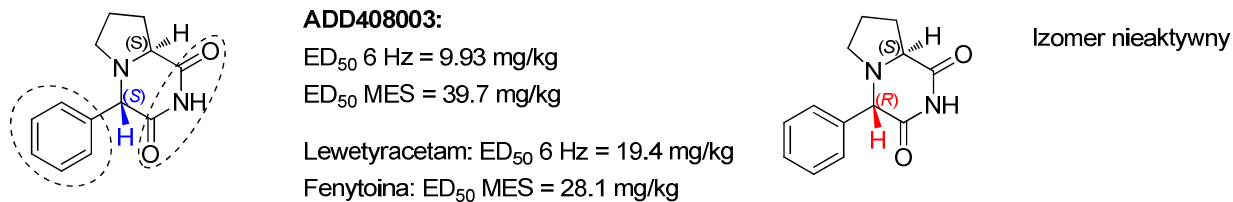
Pomimo postępu dotyczącego neurobiologicznych podłoży choroby tzw. „mechanistyczne” podejście (a więc ukierunkowane na odpowiedni cel, biorący udział w patomechanizmie) do projektowania nowych leków przeciwpadaczkowych odniosło dotychczas jedynie marginalny sukces. Podstawowym narzędziem dostarczającym nowych cząsteczek o unikalnych spektrach terapeutycznych pozostaje więc intensywny screening biologiczny związków o zróżnicowanych strukturach chemicznych. Najszerszej wykorzystywane są tu tzw. zwierzęce modele epilepsji, które najogólniej polegają na sprawdzaniu, czy i w jakim stopniu badana substancja hamuje u zwierzęcia drgawki wywołane jakimś czynnikiem. Ważną zaletą stosowania tych modeli w badaniach przesiewowych jest możliwość identyfikacji związków o nieznanym, czasami innowacyjnym mechanizmie działania. Dodatkowo pozwalają one na bezpośrednie porównanie skuteczności nowych substancji z zarejestrowanymi lekami. Najczęściej jako modele stosuje się drgawki wywołane 1) bodźcem elektrycznym, np. MES (*maximal electroshock seizure test*, test maksymalnego elektrowstrząsu), 6Hz („test psychomotoryczny”), test drgawek rozniecanych (*kindling*), 2) bodźcem chemicznym, np. Metrazolem (scMET, *subcutaneous Metrazole test*, test podskórnego metrazolu), bikukulina, pikrotoksyną, 3) bodźcem dźwiękowym. Istnieje również wiele innych, bardziej złożonych i specyficznych modeli zwierzęcych, w tym padaczki lekoopornej. Historycznie, poza nielicznymi wyjątkami, właściwości przeciwdrgawkowe leków pierwszej, drugiej oraz trzeciej generacji zostały po raz pierwszy zidentyfikowane przy użyciu modeli zwierzęcych [8,11-15].

Modele te wykorzystywane są między innymi w *Anticonvulsant Screening Program* (ASP), który jest programem rządowym USA zainicjowanym przez *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) i University of Utah. Ma on za zadanie wspierać odkrywanie nowych leków przeciwpadaczkowych poprzez identyfikowanie i rozwój przedkliniczny nowych cząsteczek, wspieranie procesu patentowania, jak również przez ułatwianie kontaktu między wynalazcami (głównie środowisko akademickie) a przemysłem farmaceutycznym. Od momentu ustanowienia ASP (rok 1975) w jego ramach przebadano ponad kilkadziesiąt tysięcy różnorodnych związków chemicznych. Kilka z nich (*Progabid*, *Felbamat*, *Topiramet*, *Lacosamid*, *Retigabina*, *Lamotrygina*, *Gabapentyna*) zostało wprowadzonych do leczenia przy znacznym wkładzie ASP we wczesnych etapach badań przedklinicznych [12,16,17,18].

ADD408003 jako struktura wiodąca dla potencjalnych nowych leków przeciwpadaczkowych

Nadrzędnym celem badań składających się na cykl prac przedstawionych do oceny było poszukiwanie innowacyjnego leku przeciwpadaczkowego poprzez modyfikację struktury wiodącej, (4*S*,8*aS*)-4-fenyloperhydropirololo[1,2-*a*]pirazyno-1,3-dionu (ADD408003). Związek ten został otrzymany w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej WUM w trakcie wcześniejszych badań. Ze względu na swoją unikalną strukturę chemiczną oraz obecność motywów strukturalnych charakterystycznych m.in. dla leków przeciwpadaczkowych pierwszej, drugiej i trzeciej generacji oraz innych substancji o właściwościach przeciwdrgawkowych, ADD408003 został z mojej inicjatywy przekazany do badań *in vivo* w ramach *Anticonvulsant Screening Program*. Wykazał on wysoką aktywność w testach przedklinicznych, porównywalną z niektórymi lekami obecnymi w terapii. Co ważne, związek bardzo silnie tłumiał drgawki wywołane impulsem elektrycznym w modelu lekoopornych napadów częściowych (model 6 Hz) [19, 20].

Ze wstępnych badań przeprowadzonych nad ADD408003 wynikało, iż jego aktywność *in vivo* jest warunkowana przez następujące cechy strukturalne: występowanie ugrupowania imidowego, obecność podstawnika fenylowego w pozycji C-4 układu perhydropirololo[1,2-*a*]pirazyny oraz konfigurację absolutną (4*S*,8*aS*) na centrach stereogenicznych.



Rysunek 1. Struktura związku ADD408003 z zaznaczeniem elementów farmakoforowych. Podane przykładowe wartości ED_{50} dotyczą testów: MES (test maksymalnego elektrowstrząsu) oraz 6Hz (test „psychomotoryczny”)

ADD408003 charakteryzuje się niską masą cząsteczkową (230 Da), co zgodnie ze statystyczną *Regułą Pięciu* Lipinskiego daje duże możliwości wprowadzania dodatkowych grup funkcyjnych i motywów strukturalnych. Związek spełnia również pozostałe trzy reguły Lipinskiego [21,22].

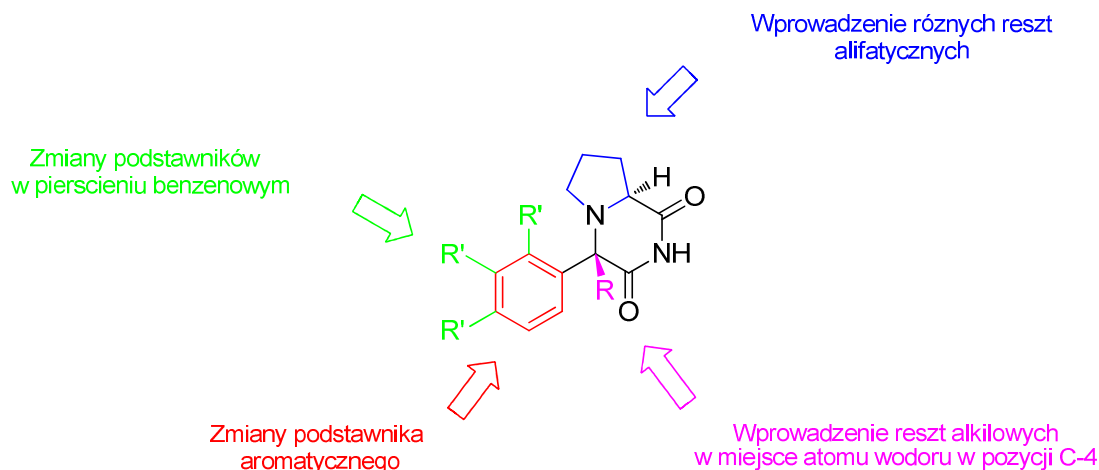
Skrótowe omówienie planu badawczego, jego realizacji oraz wyników

Na badania opisane w cyklu prac przedstawionym do oceny składały się następujące etapy:

- Zaproponowanie zmian strukturalnych mających na celu poprawę niektórych właściwości farmakologicznych związku modelowego (m.in. siłę i spektrum działania w różnych modelach epilepsji), a tym samym zwiększających jego potencjał w trakcie dalszych badań przedklinicznych. Aby umożliwić głębszą analizę zależności struktura-aktywność (SAR), a w perspektywie dać podstawy do racjonalnego projektowania kolejnych aktywnych analogów, zaproponowane zmiany były komplementarne w stosunku do tych przeprowadzonych w trakcie wcześniejszych badań.
- Opracowanie sekwencji reakcji chemicznych, która dała możliwość pozyskiwania nowych analogów w krótkim czasie, z tanich, łatwo dostępnych substratów, w sposób stereoselektywny, powtarzalny i wydajny.
- Przeprowadzenie optymalizacji każdego z etapów syntezy
- Synteza związków końcowych w skali 300-500 mg, do wstępnych badań farmakologicznych *in vivo* w ramach ASP
- Resynteza związków o najsilniejszej aktywności w większej skali (powyżej 1000 mg), do badań poszerzonych.

Z powodu braku informacji na temat mechanizmu działania ADD408003 na poziomie molekularnym, nowe kierunki optymalizacji jego struktury zostały zaproponowane w oparciu o klasyczne metody chemii medycznej. Zaplanowano:

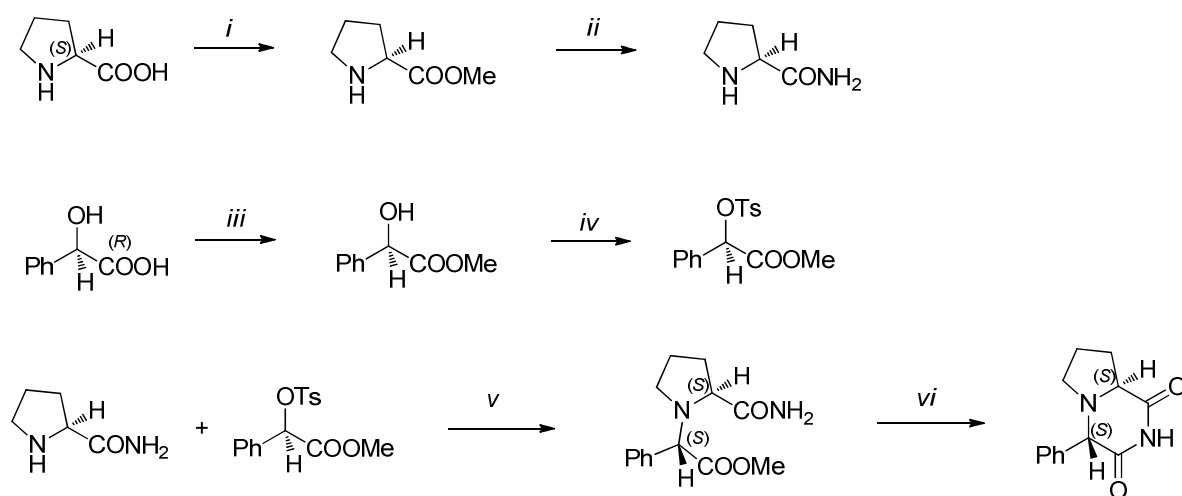
- zmiany podstawników przy pierścieniu benzenowym, w sposób racjonalny [23]. Miało to na celu otrzymanie grupy związków bliskich strukturalnie, o różnych deskryptorach fizykochemicznych takich jak logP (logarytm współczynnika podziału oktanol/woda), π (stała hydrofobowości), σ (efekt elektronowy), E_s (stała Tafta), R (refrakcja molowa). Wpływ tych modyfikacji na aktywność cząsteczki przedstawiono w pracy **H-2**.
- zmiany podstawnika fenyloвого w pozycji C-4 na podstawnik bioizosteryczny, aromatyczny lub heteroaromatyczny. Wpływ tych modyfikacji na aktywność cząsteczki przedstawiono w pracy **H-2**.
- podstawienie pierścienia benzenowego atomem (lub atomami) fluoru bądź grupami zawierającymi atomy fluoru (-CF₃, -OCF₃). Ze względu na unikalne właściwości atomu fluoru ten kierunek modyfikacji (nazywany w literaturze anglojęzycznej *fluorine scanning*) jest często wykorzystywanym narzędziem klasycznej chemii medycznej [24]. Wpływ tych modyfikacji na aktywność cząsteczki przedstawiono w pracy **H-3**.
- zastąpienie atomu wodoru w pozycji C-4 innym podstawnikiem. Zmiana ta w zamierzeniu miała hamować epimeryzację ADD408003 do nieaktywnego diastereoizomeru (4*R*,8*aS*), np. pod wpływem białek osocza. Wpływ tych modyfikacji na aktywność cząsteczki przedstawiono w pracy **H-6**.
- insercja grupy metylenowej między atom węgla C-4 a pierścień benzenowy. Wpływ tych modyfikacji na aktywność cząsteczki przedstawiono w pracy **H-6**.
- zmiana podstawnika fenyloвого w pozycji C-4 na podstawnik alifatyczny, lipofilowy. Wpływ tych modyfikacji na aktywność cząsteczki przedstawiono w pracy **H-6**.
- zastąpienie sztywnego, skondensowanego pierścienia piroolidynowego ADD408003 konformacyjnie elastycznym łańcuchem alifatycznym. Wpływ tych modyfikacji na aktywność cząsteczki przedstawiono w pracy **H-4**.



Rysunek 2. Schematyczna prezentacja zaplanowanych modyfikacji struktury wiodącej.

Tak szeroki plan optymalizacji struktury wiodącej wymagał opracowania drogi syntezy, która dała by możliwość pozyskiwania nowych analogów w krótkim czasie, z tanich, łatwo dostępnych substratów, w sposób stereoselektywny, powtarzalny i wydajny.

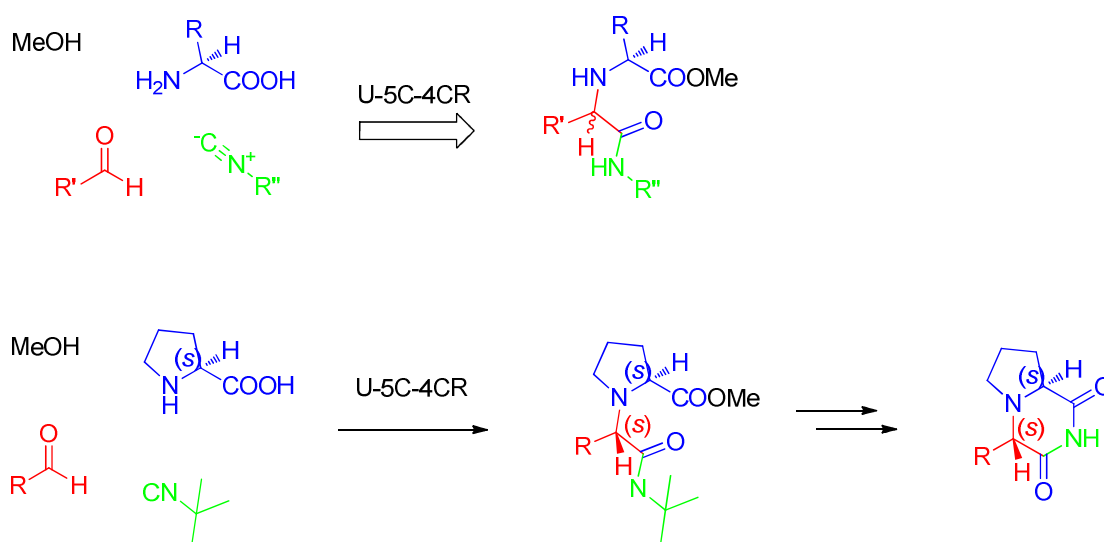
Sposób otrzymywania ADD408003 opracowany w trakcie wcześniejszych badań został przedstawiony na Schemacie 1 [19,20]. Jest to synteza wymagająca użycia dwóch chiralnych, enancjomerycznie czystych substratów. W wyniku szeregu przekształceń substraty te dają acykliczny prekursor pierścienia 2,6-diketopiperazyny, który łatwo ulega cyklokondensacji intramolekularnej, prowadząc do finalnego związku. Łączna wydajność syntezy wynosiła około 30% (z enancjomerycznie czystego kwasu (*R*)-migdałowego), z sześciu etapów.



Schemat 1. Opisana synteza ADD408003. *i.* SOCl₂, MeOH, następnie Et₃N *ii.* NH₃, MeOH *iii.* AcCl, MeOH, t.pok. *iv.* TsCl, pirydyna, CH₂Cl₂ *v.* Pirydyna, CH₃CN *vi.* EtONa, EtOH.

Powyższa synteza była by jednak niemożliwa do zastosowania w celu wydajnego i szybkiego otrzymania wszystkich zaplanowanych pochodnych ADD408003 o różnych podstawnikach w pozycji C-4. Po pierwsze, wprowadzanie różnorodnych grup aromatycznych w miejsce pierścienia benzenowego tą drogą było by bardzo ograniczone ze względu na znikomą dostępność handlową odpowiednich pochodnych kwasu migdałowego (kwasów α -hydroxy- α -arylooctowych) zarówno w postaci enancjomerycznie czystej jak i racematów. Z kolei synteza takich prekursorów była by żmudna i spowodowała by wydłużenie całej sekwencji reakcji o co najmniej dwa etapy. Analogicznie, modyfikacja polegająca na zastąpieniu skondensowanego pierścienia piperolidyny ADD408003 elastycznym łańcuchem alkilowym wymagała by zastąpienia wyjściowej *L*-Proliny innym aminokwasem na samym początku sekwencji syntetycznej. Co więcej, synteza ta nie mogła by zostać zastosowana w otrzymywaniu pochodnych dipodstawionych przy atomie węgla C-4, ze względu na brak reaktywności trzeciorzędowych sulfonianów oraz halogenków w reakcjach *N*-alkilowania. Z powyższych powodów zaplanowana szeroka optymalizacja ADD408003 wymagała opracowania alternatywnej drogi syntezy.

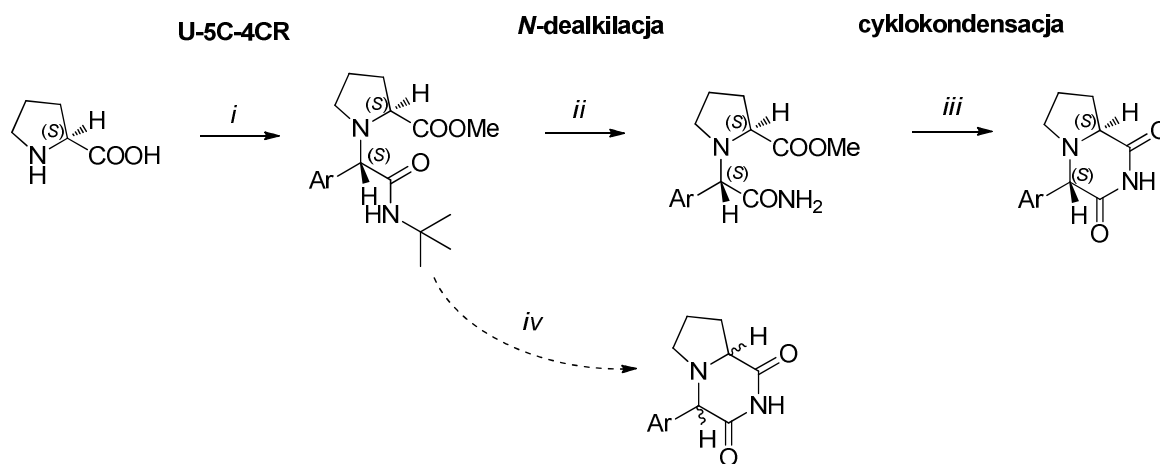
Przegląd literatury skierował moją uwagę na reakcję wielokomponentową Ugi w wariacie U-5C-4CR (*Ugi-five-center-four-component reaction*, Schemat 2) [25]. Reakcja ta przebiega z użyciem dwufunkcyjnego, chiralnego substratu, α -aminokwasu, aldehydu, alkoholu oraz izocyjanku. Jej produktem jest odpowiedni amidoester, który w toku dalszych przekształceń mógłby stać się acyklicznym prekursorem 2,6-diketopiperazyny (2,6-DKP).



Schemat 2. Przebieg U-5C-4CR i ogólny zarys planu syntezy.

U-5C-4CR przebiega z wytworzeniem nowego centrum chiralnego, a większość literaturowych przykładów reakcji z zastawianiem *L*-aminokwasów wskazywało na diastereoselektywność w kierunku izomerów (*S,S*) [25,26]. Jest to bardzo istotne, ponieważ pochodne ADD408003 o takiej właśnie konfiguracji absolutnej są aktywne. Opisane przypadki reakcji Ugi w wariacie U-5C-4CR przebiegały z wysokimi wydajnościami. Kolejną ważną jej zaletą jest niezwykle prosta preparatyka. U-5C-4CR wydawała się reakcją niemalże idealną do zastosowania w kluczowym etapie syntezy zaplanowanych analogów ADD408003 również ze względu na to, że substratem warunkującym podstawienie w zaplanowanym głównym punkcie zmienności cząsteczki, atomie węgla C-4, byłby łatwo dostępny, tani komponent karbonylowy (aldehyd lub keton).

W publikacji **H-1** opisano adaptację U-5C-4CR do syntezy pochodnych ADD408003. Zaplanowane związki otrzymano w trzech etapach, wykorzystując szlak: reakcja Ugi (U-5C-4CR) → *N*-de-tertbutylowanie amidu → cyklokondensacja intramolekularna, według Schematu 3.



Schemat 3. Synteza C-4 arylowych pochodnych ADD408003. *i.* ArCHO, *t*Bu-NC, MeOH, TiCl₄, t.pok; następnie rozdział chromatograficzny; *ii.* BF₃*2CH₃COOH, t.pok. *iii.* NaOH, EtOH, t.pok.; *iv.* BF₃*2CH₃COOH, 90°C

W U-5C-4CR katalizowanej kwasem Lewisa po raz pierwszy użyto par aminokwasy drugorzędowe - aldehydy aromatyczne[†], co dało dostęp do prekursorów pochodnych ADD408003 z różnymi podstawnikami aromatycznymi w pozycji C-4. Zbadano szczegółowo wpływ temperatury, katalizatora oraz czasu reakcji na wydajność i diastereoselektywność procesu. Choć modelowa reakcja kondensacji *L*-Proliny, 4-chlorobenzaldehydu, izocyjanku

[†] pary te mogły by uchodzić za niereaktywne ze względów sterycznych i elektronowych [26]

tert-butylu oraz metanolu wykazała wysoką tolerancję na zmiany tych czynników, najlepsze wyniki uzyskano prowadząc proces w temperaturze pokojowej, przez okres nie krótszy niż 24 godziny, w obecności TiCl_4 jako katalizatora. Zbadano również reaktywność różnych aldehydów aromatycznych, aminokwasów drugorzędowych. Ważną obserwacją było to, że w każdym przypadku diastereoindukcja zachodziła w kierunku pożądaných diastereoizomerów (*S,S*) (współczynniki diastereomeryczne d_r w granicach 3.5/1 do 9/1) a niewielkie ilości powstających izomerów (*S,R*) można było w większości przypadków oddzielić za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym.

Użycie w reakcji U-5C-4CR izocyjanku *tert*-butylu miało następujące racjonalne przesłanki:

- jest to izocyjanek dostępny w handlu, stosunkowo tani
- jest to izocyjanek lotny. Jego nieprzereagowana część jest więc łatwa do usunięcia przez oddestylowanie oraz nie towarzyszy mu nieprzyjemna, trudna do usunięcia woń charakterystyczna dla większości izocyjanków
- jest to substrat przestrzennie stłoczony, co zwiększa diastereoselektywność reakcji
- powoduje wprowadzenie do adduktu ugrupowania *tert*-butylowego, które można odszczepić od amidowego atomu azotu.

Pionierskie badania Ugi nad reakcją zamknięcia pierścienia 2,6-diketopiperazyny przez cyklokondensację produktów U-5C-4CR o podstawionym azocie amidowym wymagały zazwyczaj użycia drastycznych warunków [27]. W przypadku otrzymywanych przeze mnie adduktów o labilnych centrach stereogenicznych, pochodnych fenyloglicyny, użycie takich warunków powodowało znaczną epimeryzację w kierunku nieaktywnych izomerów (*S,R*). Tak więc, aby następna reakcja cyklokondensacji molekularnej mogła przebiegać w łagodnych warunkach, nie powodujących epimeryzacji na centrach stereogenicznych produktów, w kolejnym etapie syntezy konieczne było usunięcie grupy *tert*-butylowej z amidu.

N-dealkilowanie amidów jest typem reakcji bardzo trudnym do przeprowadzenia. Wymaga ono najczęściej użycia mocnych kwasów w podwyższonej temperaturze i nie zawsze jest powtarzalne [28-32]. Początkowe próby *N*-detertbutylowania adduktów reakcji U-5C-4CR okazały się zupełnie nieskuteczne. Zastosowanie różnych czynników kwasowych, w tym

powszechnie stosowanego w literaturze kwasu trójfluorooctowego [26,28,29], nie przyniosło spodziewanych rezultatów. Najczęściej obserwowano brak reakcji bądź bezpośrednią konwersję substratu do finalnej pochodnej 2,6-diketopiperazyny. Ta z pozoru użyteczna, bezpośrednia reakcja zachodziła jednak z bardzo niską (14-22%) wydajnością i jednoczesną epimeryzacją na obu centrach stereogenicznych C-4 oraz C-8a – powstawała więc trudna do rozdzielenia mieszanina wszystkich czterech możliwych enancjomerów związku finalnego. Zaskakująco dobre rezultaty uzyskano przez zastosowanie kompleksu trójfluorku boru z kwasem octowym. Czynniki te okazały się bardzo efektywne już w temperaturze pokojowej, nie powodując cyklokondensacji i epimeryzacji prekursora 2,6-diketopiperazyny. Reakcja przebiegała z wysoką wydajnością, rzędu 70%. Podniesienie temperatury procesu do 40 °C powodowało jego przyspieszenie, z kolei w wyższych temperaturach obserwowano powstawanie znacznych ilości produktów ubocznych (cyklicznych i epimerycznych).

Ostatni etapem zaplanowanej syntezy była cyklokondensacja intramolekularna w środowisku zasadowym, prowadząca do finalnych produktów z bardzo dobrą wydajnością.

Powyższa synteza, opisana w pracy **H-1**, była kluczowym osiągnięciem umożliwiającym otrzymanie większości zaplanowanych pochodnych ADD408003 mono-podstawionych przy atomie węgla C-4. Syntezę tych związków oraz wyniki ich badań *in vivo* w zwierzęcych modelach epilepsji opisano w publikacjach **H-2**, **H-3** i **H-4**.

W pracy **H-2** otrzymano pochodne, w których pierścien benzenowy ADD408003 został podstawiony atomem -Cl lub grupami -CH₃, OCH₃ w różnych pozycjach: *orto*-, *meta*-, bądź *para*-. Analizując wyniki badań *in vivo* zauważono, iż aktywność w 'klasycznych' modelach epilepsji: maksymalnego elektrowstrząsu (MES) oraz podskórnego Metrazolu (scMET) była charakterystyczna dla pochodnych podstawionych w pozycji *meta*-. Jednocześnie związki te wykazywały umiarkowaną ogólną toksyczość neurologiczną w teście *rotarod*. Co ciekawe, skuteczność tłumienia drgawek w modelu lekoopornych napadów częściowych (model 6 Hz, 32mA) była dla większości pochodnych wyższa niż w 'klasycznych' testach i zaledwie w bardzo małym stopniu zależała ona od położenia podstawnika. Analizując wpływ rodzaju podstawnika zauważono, że pochodne -Cl oraz -CH₃ mają silniejsze działanie niż -OCH₃.

Zgodnie ze schematem decyzyjnym Instytucji Partnerskiej (ASP), pochodne *para*-Cl oraz *para*-CH₃ zostały zakwalifikowane do badań poszerzonych polegających na wyznaczeniu

dawk efektywnych ED₅₀ w modelu 6 Hz u myszy. Związki te wykazały dobrą aktywność, odpowiednio 32.24 oraz 41.66 mg/kg.

Kolejną grupę pochodnych otrzymanych w pracy **H-2** stanowiły analogi ADD408003 w których pierścień benzenowy zastąpiono podstawnikiem aromatycznym bioizosterycznym (furanu lub tiofenu), bądź większym (naftalenu). Zaskakująco, żaden z tych związków nie wykazał znaczącego działania przeciwdrgawkowego ani toksyczności neurologicznej w modelach MES, scMET, *rotarod*, w dawce 100 mg/kg.

Kontynuując badania nad wpływem podstawników w obrębie pierścienia benzenowego ADD408003 na aktywność przeciwdrgawkową *in vivo*, w pracy **H-3** otrzymano szereg pochodnych fluorowych. Ze względu na unikalne właściwości atomu fluoru ten typ podejścia do optymalizacji struktury wiodącej (tzw. *fluorine scanning*) jest obecnie szeroko stosowany [24]. Wobec nieznajomości mechanizmu działania ani typu metabolizmu ADD408003, podstawową przesłanką do wprowadzenia atomu fluoru w obręb jego cząsteczki było zwiększenie lipofilowości, co powinno umożliwić łatwiejszą penetrację bariery krew-mózg i w efekcie zwiększyć siłę działania w obrębie OUN.

Większość otrzymanych związków charakteryzowała się wyższą aktywnością przeciwdrgawkową w modelach przesiewowych (MES, scMET oraz 6 Hz) niż analogi nie zawierające atomów fluoru. Było to zgodne z hipotezą iż zwiększenie lipofilowości ADD408003 powinno zaowocować silniejszym działaniem ośrodkowym. Najsilniej działającymi związkami w badaniach przesiewowych okazały się pochodne *m*-CF₃ oraz *m*-OCF₃ i zakwalifikowano je do badań poszerzonych. Zostały wyznaczone ich dawki efektywne ED₅₀ dla testów podstawowych (MES, scMET, 6Hz, TOX) oraz aktywności w modelach drgawek rozniecanych u myszy (*Corneally Kindled Mouse*, CKM). Pochodna *m*-OCF₃ została również zbadana w modelu drgawek rozniecanych u szczurów (*Hippocampal Kindled Rat*, HKR) oraz dożylnego wlewu Metrazolu (*Intravenous Metrazol Seizure Threshold Test*, ivMET). Oba związki wykazały aktywności porównywalne lub wyższe niż niektóre leki odniesienia (takie jak *Lewetyracetam*, *Fenytoina*, *Kwas Walproinowy*, *Lacosamid*). Istotną ich cechą była bardzo szeroka aktywność w ‘klasycznych’ modelach zwierzęcych (MES, scMET) a jednocześnie wysoka skuteczność w modelach epilepsji lekoopornej (6Hz, CKM).

Szczególnie wysoką aktywność przeciwdrgawkową wykazała pochodna *m*-OCF₃, która dodatkowo podnosiła próg drgawkowy w modelu ivMET. W celu dalszej optymalizacji przeprowadzono syntezę jej trzech pozostałych izomerów optycznych. Uzyskano także wszystkie możliwe enancjomery homologu o dobudowanym sześcioczłonowym pierścieniu alifatycznym (pochodne pirydo[1,2-*a*]pirazyny). Jako substraty użyto enancjomerycznie czyste izomery proliny oraz kwasu piperydino-2-karboksyłowego. Wyniki przesiewowych badań farmakologicznych wykazały wysoką aktywność przeciwdrgawkową izomerów (*SS*) oraz (*RR*), porównywalną ze związkiem macierzystym *m*-OCF₃. Ponieważ nie zaobserwowano wyraźniej poprawy działania, oraz z uwagi na mniejszą dostępność aminokwasów używanych jako substraty.

Kolejną badaną grupą pochodnych 2,6-diketopiperazyny były monocykliczne analogi ADD408003, opisane w publikacji **H-4**. Związki te, o nieco bardziej elastycznej strukturze, zostały otrzymane w oparciu o reakcję U-5C-4CR lipofilowych aminokwasów: *L*-waliny, *L*-fenyloalaniny, *L*-leucyny, *L*-izoleucyny, *L*-fenyloglicyny, *N*-benzyloglicyny oraz *N*-fenyloglicyny. Proces przebiegał stereoselektywnie, a największe współczynniki diastereomeryczne uzyskano dla aminokwasów sterycznie słończonych, o łańcuchach alifatycznych rozgałęzionych przy atomach węgla C-2: *L*-leucyny i *L*-waliny (dr odpowiednio 9/1 i 7.3/1).

Otrzymane finalne pochodne charakteryzowały się słabszą aktywnością w modelach przesiewowych (MES, scMET oraz 6 Hz) niż ADD408003. Wydawała się ona również być w mniejszym stopniu zależna od konfiguracji na stereogenicznych atomach węgla niż w przypadku struktury wiodącej, prawdopodobnie z powodu większej swobody konformacyjnej. Największą siłą tłumienia drgawek w modelach podstawowych wykazały pochodne *L*-waliny oraz *L*-fenyloglicyny, z czego jedynie ta pierwsza była aktywna w modelu lekoopornych napadów częściowych 6 Hz.

Synteza opracowana w pracy **H-1** umożliwiła otrzymanie większości zaplanowanych pochodnych ADD408003 mono-podstawionych przy atomie węgla C-4, opisanych w publikacjach **H-2**, **H-3**, **H-4**. W reakcjach tych stosowano jako komponenty karbonyłowe wyłącznie aldehydy. W publikacji **H-5** opisano natomiast po raz pierwszy zastosowanie aminokwasów drugorzędowych wraz z ketonami jako komponentami kondensacji U-5C-4CR. Ketony są uznawane za mniej reaktywne komponenty karbonyłowe reakcji Ugi niż aldehydy

[33]. Dodatkowo, pary aminokwas drugorzędowy-keton mogły by uchodzić za niedostatecznie reaktywne ze względu na trudność wytworzenia stabilnej iminy oraz na znaczne stłoczenie przestrzenne związków przejściowych. W tym kontekście, pozytywny rezultat modelowej reakcji *L*-proliny, najprostszego z ketonów, acetonu, izocyjanku *tert*-butylu oraz metanolu, był bardzo obiecujący. Kondensacja zaszła bowiem z akceptowalną wydajnością 30%, nawet bez użycia katalizatora, w temperaturze pokojowej, po 24 godzinach. Przeprowadzono optymalizację procesu uzyskując maksymalną wydajność 67%. Pozytywny wpływ na wynik reakcji miało wydłużenie czasu reakcji do 72 godzin oraz zastosowanie TiCl_4 . Wpływ obecności i rodzaju katalizatora był znacznie bardziej zaznaczony niż w wypadku kondensacji z użyciem aldehydów aromatycznych (przedstawionych w publikacji **H-1**).

Analizowano również wpływ budowy komponentów kondensacji stwierdzając, że najlepsze efekty uzyskuje się dla substratów o niskim stłoczeniu sterycznym. Najwyższe wydajności obserwowano dla ketonów cyklicznych i nierozgałęzionych. Wysokie wydajności kondensacji obserwowano dla *L*-proliny, podczas gdy homologiczny kwas *L*-pipekolinowy oraz drugorzędowe aminokwasy o otwartych łańcuchach alifatycznych były znacznie mniej reaktywne. Zastąpienie rozgałęzionego izocyjanku *tert*-butylu liniowym izocyjankiem *n*-butylu w większości przypadków zaowocowało zwiększeniem wydajności kondensacji.

W reakcjach U-5C-4CR homochiralnych aminokwasów i ketonów niesymetrycznych otrzymano addukty o dwóch centrach sterogenicznych. Diastereoselektywność w tych przypadkach była trudniejsza do przewidzenia i interpretacji. Ogólnie, w większości tego typu reakcji obserwowano powstawanie nadmiaru izomeru (*S,S*), w niektórych przypadkach diastereoindukcja była jednak zaskakująco niska bądź nie obserwowano jej wcale.

Sekwencję reakcji: Ugi (U-5C-4CR) z zastosowaniem ketonów → *N*-de-*tert*butylowanie amidu → cyklokondensacja intramolekularna, opracowaną w publikacji **H-5**, wykorzystano do otrzymania niektórych analogów ADD408003, dipodstawionych przy atomie węgla C-4, opisanych w pracy **H-6**.

Pochodne przedstawione w publikacji **H-6** charakteryzowały się dużym stopniem różnorodności strukturalnej. Zaprojektowano je bowiem tak, aby wprowadzone zmiany w odniesieniu do ADD408003 dały podstawę do uzupełnienia analizy struktura-aktywność

przedstawionej w pracach **H-2**, **H-3**, **H-4**. W pierwszej kolejności otrzymano enancjomer ADD408003 o konfiguracji (4*R*,8*aR*). Charakteryzował się on zdecydowanie słabszą aktywnością w ‘klasycznych’ testach MES i scMET niż związek wyjściowy. Wartość współczynnika ED₅₀ w modelu lekoopornych napadów częściowych 6 Hz była niższa niż ADD408003, jednak wciąż porównywalna z niektórymi lekami odniesienia. Kolejna modyfikacja, insercja grupy metylenowej między atom węgla C-4 a pierścień benzenowy struktury wiodącej, spowodowała znaczny spadek aktywności. Z kolei pochodne ketonów alifatycznych, di-podstawione w pozycji C-4 układu perhydropirolu[1,2-*a*]pirazyny charakteryzowały się wysoką neurotoksycznością.

Modyfikacje polegające na zastąpieniu atomu wodoru w pozycji C-4 innym podstawnikiem wymagały zastosowania po raz pierwszy ketonów aromatycznych jako komponentów karbonylowych reakcji U-5C-4CR. Ze względów sterycznych i elektronowych reakcje te przebiegały z niskimi wydajnościami, a otrzymane pochodne miały aktywności zbliżone do związku macierzystego.

W oparciu o inny wariant reakcji Ugi, intramolekularną kondensację U-4C-3CR (*Ugi-five-center-four-component reaction*) [34-36], otrzymano związek będący hybrydą ADD408003 i *Lewetyracetamu*. Pochodna ta charakteryzowała się niższą aktywnością niż oba związki macierzyste, porównywalną do *Etosuksimidu*.

Podsumowanie uzyskanych wyników ze wskazaniem najważniejszych osiągnięć i elementów nowości.

Podsumowując, za najważniejsze osiągnięcia i najistotniejsze elementy nowości cyklu prac badawczych „Zastosowanie wielokomponentowej reakcji Ugi jako kluczowego etapu syntezy nowych pochodnych 2,6-diketopiperazyny o wysokiej aktywności przeciwdrgawkowej w zwierzęcych modelach epilepsji” uważam:

- 1) Zaproponowanie i wprowadzenie takich zmian w obrębie cząsteczki ADD408003, które znacząco rozszerzyły wiedzę na temat elementów farmakoforowych warunkujących aktywność *in vivo* grupie pochodnych pirolu[1,2-*a*]pirazyny. Uzyskane informacje wyznaczają kierunki dalszego projektowania aktywnych

analogów. Żadna z najbardziej obiecujących zmian strukturalnych nie doprowadziła do znacznego wzrostu masy cząsteczkowej względem cząsteczki wyjściowej, co pozostawia duże możliwości dalszej optymalizacji.

- 2) Uzyskanie na drodze optymalizacji klasycznymi metodami chemii medycznej fluorowej pochodnej ADD408003, (4*S*,8*aS*)-4-(3-trifluorometoksyfenylo)-perhydropirololo[1,2-*a*]pirazyno-1,3-dionu. Związek ten wykazuje bardzo wysoką, szeroką aktywność w modelach zwierzęcych porównywalną lub wyższą niż większość leków odniesienia (m.in. *Lewetyracetam*, *Fenytoina*, *Kwas Walproinowy*, *Lacosamid*, szczegółowe porównanie zamieszczono w pracy **H-3**). Istotną cechą tego związku jest jego wysoka aktywność w ‘klasycznych’ modelach zwierzęcych (MES, scMET) a jednocześnie bardzo dobra skuteczność w modelach epilepsji lekoopornej (6Hz, CKM, KIN). Związek ten, podobnie jak ADD408003, jest dalej badany w ramach ASP.
- 3) Opracowanie sekwencji reakcji prowadzących do pochodnych ADD408003 różnie podstawionych przy atomie węgla C-4. Z punktu widzenia użytkowego nowa droga syntezy stworzyła możliwość: pozyskiwania ogromnej różnorodności nowych analogów, zależnej głównie od reaktywności tanich i szeroko dostępnych aldehydów lub ketonów, w krótkim czasie, w sposób wysoce stereoselektywny w kierunku bioaktywnej konfiguracji absolutnej ADD408003, powtarzalny, wydajny, nie wymagający użycia skomplikowanej aparatury, wysoce palnych rozpuszczalników, atmosfery gazu obojętnego ani grzania. Ostatnie badania nad zastosowaniem tej sekwencji reakcji do syntezy ADD408803 w skali kilkunastu gramów wykazały, iż na żadnym etapie nie jest niezbędne oczyszczanie produktów pośrednich przez chromatografię kolumnową. Stąd możliwości aplikacyjne tej syntezy w przemyśle są znaczne.

Z naukowego punktu widzenia najistotniejsze elementy nowości tej syntezy to:

- zastosowanie w reakcji U-5C-4CR aldehydów aromatycznych oraz ketonów alifatycznych lub arylo-alifatycznych jako partnerów kondensacji z aminokwasami cyklicznymi o drugorzędowych grupach aminowych. Jest to duży, oryginalny wkład w poszerzenie zakresu substratowego reakcji.

- szczegółowe zbadanie diastereoselektywności reakcji U-5C-4CR z użyciem nowych komponentów. Jest to wkład o tyle istotny, że pogłębia wiedzę na temat stereochemicznego przebiegu reakcji.
 - odkrycie nowego czynnika promującego bardzo trudną reakcję *N*-de-*tert*-butylowania grupy amidowej w temperaturze pokojowej. Wykazano również zalety płynące z zastosowania tego czynnika w konkretnym przypadku de-alkilowania produktów kondensacji U-5C-4CR.
- 4) Opracowanie podobnej sekwencji reakcji w oparciu o intramolekularną kondensację U-4C-3CR. Dzięki niej otrzymano hybrydę ADD408003 i *Lewetyracetamu*. Co prawda pochodna ta nie wykazała tak silnego działania *in vivo* co związki macierzyste, jednak opracowana synteza otwiera drogę do nowych, ciekawych strukturalnie analogów perhydropirolol[1,2-*a*]pirazyno-1,3,5-trionu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej.

Bibliografia

1. Lemke, T.L.; Williams, D. A. (red.) Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th edition, Baltimore, MA: Lippincott Williams & Wilkins, **2008**
2. Wermuth, C. G. (red.) The Practice of Medicinal Chemistry, 3rd edition, Burlington, MA: Academic Press, **2008**
3. Fisher, R. S.; van Emde Boas, W.; Blume, W.; Elger, C.; Genton, P.; Lee, P.; Engel Jr, J. *Epilepsia* **2005**, 46, 470-472
4. Browne, T. R.; Holmes, G. L.; Epilepsy, *New Engl. J. Med.* **2001**, 344, 1145-1151
5. Satishchandra, P.; Trimble, M. R.; On Being Seizure-free, *Epilepsy Behav.* **2001**, 2, 4-7
6. Shorvon, S., *Epilepsia* **2009**, 50 (Suppl. 3), 69-92
7. Shorvon, S., *Epilepsia* **2009**, 50, (Suppl. 3), 93-130
8. Perucca, E.; French, J.; Bialer, M., *Lancet Neurol.* **2007**, 6, 793–804
9. Brodie, M. J., *Epilepsy Res.* **2001**, 45, 3–6
10. Kwan, P.; Brodie M. J., *N. Engl. J. Med.* **2000**, 342, 314–319
11. White, S. H.; Bialer, M., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 68-82
12. Stables, J. P.; Kupferberg, H. J.; The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: Preclinical Anticonvulsant Screening Project. Chapter 16; National Institute of

- Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, http://www.ninds.nih.gov/research/asp/addadd_review.pdf (ostatni dostęp: 30.12.2014)
13. Löscher, W.; Schmidt, D., *Epilepsy Res.* **1994**, 17, 95–134
 14. Smith, M.; Wilcox, K. S.; White, H. S., *Neurotherapeutics* **2007**, 4, 12–17
 15. Kupferberg, H., *Epilepsia* **2001**, 42 (Suppl. 4), 7–12
 16. Krall, R. L.; Penry, J. K.; Kuperberg, H. J.; Swinyard, E. A., *Epilepsia* **1978**, 19, 393–408
 17. Krall, R. L.; Penry, J. K.; White, B. G.; Kuperberg, H. J.; Swinyard, E. A., *Epilepsia* **1978**, 19, 409–428
 18. Opisy testów farmakologicznych wykonywanych przez Anticonvulsant Screening Program wraz ze szczegółowymi odnośnikami do literatury źródłowej dostępne są na stronach internetowych NIH: http://panache.ninds.nih.gov/Models_List1.aspx oraz <http://www.ninds.nih.gov/research/asp/testdesc.htm#test15> (ostatni dostęp: 30.12.2014)
 19. Dawidowski, M., Herold, F., Chodkowski, A., Kleps, J., Szulczyk, P., Wilczek, M., *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4859-4869
 20. Herold, F.; Dawidowski, M.; Wolska, I.; Chodkowski, A.; Kleps, J.; Turło, J.; Zimniak, A., *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2091-2098
 21. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, 23, 3-25
 22. Lipinski, C. A., *J. Pharm. Tox. Meth.* **2000**, 44, 235-249
 23. Topliss J., *J. Med. Chem.* **1977**, 4, 463-469
 24. Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V., *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 320-330
 25. Demharter, A.; Hörl, W.; Eberhardt, H.; Ugi, I., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 173-175
 26. Godet, T. ; Bonvin, Y. ; Vincent, G. ; Merle, D. ; Thozet, A. ; Ciufolini, M. A., *Org. Lett.* **2004**, 19, 3281–3284
 27. Ugi, I.; Hörl, W.; Hanusch-Kompa, C.; Schmid, T.; Herdtweck, E., *Heterocycles* **1998**, 47, 965–975
 28. Schleicher, K. D.; Jamison, T. F., *Org. Lett.* **2007**, 9, 875-878
 29. Zhou, F.; Ding, K.; Cai, Q., *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 12268-12271
 30. Mahalingam, A. K.; Xiongyu Wu, X.; Alterman, M., *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3051–3053
 31. Lacey, R. N., *J. Chem. Soc.*, **1960**, 1633-1639
 32. Conover, L. H.; Butler, K.; Johnston, J. D.; Korst, J. J.; Woodward, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, 84, 3222-3224
 33. Simila, S. T. M.; Martin, S. F., *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 4501–4504

34. Short, K. M.; Mjalli, A. M. M., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 359–362
35. Harriman, G. C. B., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5591–5594
36. Hanusch-Kompa, C.; Ugi, I., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2725–2728

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Badania naukowe rozpocząłem w trakcie studiów magisterskich, jako uczestnik Koła Naukowego przy Katedrze i Zakładzie Technologii Środków Leczniczych Akademii Medycznej w Warszawie. Pod kierunkiem naukowym Prof. dr hab. Franciszka Herolda oraz bezpośrednią opieką dr Jacka Stefanowicza prowadziłem prace z zakresu syntezy nowych pochodnych tropanu o potencjalnym atypowym działaniu przeciwpsychotycznym.

Badania nad poszukiwaniem nowych substancji chemicznych jako aktywnych składników innowacyjnych leków były dla mnie tak interesujące, iż postanowiłem poświęcić im swoją dalszą karierę zawodową. W roku 2005 podjąłem pracę w charakterze asystenta w Katedrze i Zakładzie Technologii Środków Leczniczych Akademii Medycznej w Warszawie. Początkowo zaangażowałem się w główny nurt badań prowadzonych wówczas w Katedrze, a mianowicie syntezę nowych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i transportera serotoniny (SERT), o potencjalnym działaniu przeciwdepresyjnym. Badania te były prowadzone we współpracy m.in. z Instytutem Farmakologii PAN w Krakowie, Narodowym Instytutem Leków w Warszawie oraz Instytutem Biologii Medycznej Uniwersytetu w Tromsø. Obejmowały one syntezę chemiczną oraz badania strukturalne oraz dwukomponentowych pochodnych pirydo[1,2-*c*]pirymidyny oraz pirolo[1,2-*a*]pirazyny. W trakcie tych badań otrzymano związki o nanomolowych powinowactwach do receptorów 5-HT_{1A} i transportera serotoniny (SERT) i aktywności w testach behawioralnych.

Kontynuowałem również kierunek badań od którego rozpoczęła się moja kariera naukowa, a więc badania nad nowymi aryloamidowymi pochodnymi tropanu jako ligandami receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i dopaminergicznych D₂. Otrzymaliśmy związki o zróżnicowanych profilach receptorowych. W zależności od rodzaju reszt aryloalkilowych

przy atomie azotu tropanu, lub reszt arylowych w pozycjach „ α ” lub „ β ” ugrupowania aminoacylowego, związki wykazały silną (nM) wiązalność z receptorami 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} lub D₂. Niektóre z otrzymanych analogów tropanu wykazały wysoką aktywność w stosunku do wszystkich trzech wspomnianych receptorów, jak również korzystny indeks Meltzera (pK_i 5-HT_{2A}/pK_i D₂), charakterystyczny dla leków o atypowych właściwościach antypsychotycznych.

Punktem zwrotnym w mojej karierze naukowej były badania nad syntezą asymetryczną i strukturą przestrzenną stereoizomerów pochodnych pirolo[1,2-*a*]pirazyny oraz pirydo[1,2-*a*]pirazyny. Zauważyłem wówczas, że związki te posiadają motywy strukturalne charakterystyczne dla m.in. dla leków przeciwpadaczkowych pierwszej, drugiej i trzeciej generacji oraz innych substancji o właściwościach przeciwdrgawkowych. W roku 2008 z mojej inicjatywy została podjęta współpraca naukowa z *Anticonvulsant Screening Program*. Wstępne wyniki badań *in vivo* w zwierzęcych modelach epilepsji wykazały silną aktywność przeciwdrgawkową niektórych związków. Szczególnie interesującym zjawiskiem wydała mi się stereoselektywność tego działania. Prace nad syntezą, strukturą i właściwościami przeciwdrgawkowymi analogów pirolo[1,2-*a*]pirazyny, pirydo[1,2-*a*]pirazyny oraz 2,6-diketopiperazyny stały się głównym tematem mojej rozprawy doktorskiej, obronionej w 2010 roku. Za główne osiągnięcie tych badań uważam odkrycie związku ADD408003 o stereoselektywnym, silnym i szerokim działaniu *in vivo* w zwierzęcych modelach epilepsji.

Równocześnie zainteresowałem się techniką HPLC i zaangażowałem się w prowadzone w Katedrze prace nad jej zastosowaniem w analizie stopnia akumulacji pierwiastków śladowych oraz produkcji metabolitów wtórnych przez grzybnię *Lentinula edodes* (Berk.) oraz *Streptomyces tsukubaensis*.

Wyniki wymienionych badań zostały szczegółowo opisane w następujących publikacjach naukowych:

1. F. Herold, **M. Dawidowski**, I. Wolska, A. Chodkowski, J. Kleps, J. Turło, A. Zimniak *The Synthesis of New Diastereomers of (4S,8aS)- and (4R,8aS)-4-phenylperhydropyrrole[1,2-*a*]pyrazine-1,3-dione* **Tetrahedron: Asymmetry** 18, (2007), 2091-2098; **IF₂₀₀₇= 2.796; 25 pkt. MNiSW**

2. **M. Dawidowski***, F. Herold., M. Wilczek, J. Kleps, I. Wolska, J. Turło, A. Chodkowski, P. Widomski, A. Bielejewska *The synthesis and conformational analysis of optical isomers of 4-phenyl-perhydropyrido[1,2-a]pyrazine-1,3-dione: An example of "solid state– frozen" dynamics in nitrogen-bridged bicyclic 2,6-diketopiperazines* **Tetrahedron: Asymmetry** 20, (2009), 1759-1766; **IF₂₀₀₉=2.625; 25 pkt. MNiSW**
3. F. Herold, Ł. Izbicki, A. Chodkowski, **M. Dawidowski**, M. Król, J. Kleps, J. Turło, I. Wolska, G. Nowak, K. Stachowicz, M. Dybała, A. Siwek, M. Nowak, E. Pieniżek, M. Jarończyk, I. Sylte, A. P. Mazurek *Novel 4-aryl-pyrido[1,2-c]pyrimidines with dual SSRI and 5-HT_{1A} activity: Part 2* **Eur. J. Med. Chem.** 44, (2009), 4702-4715; **IF₂₀₀₉= 3.269; 40 pkt. MNiSW**
4. M. Tkaczyk, **M. Dawidowski**, F. Herold, I. Wolska, I. Wawer ¹³C CPMAS NMR, XRD and DFT study of selected 2,6-diketopiperazines **J. Mol. Str.** 975, (2010), 78-84, **IF₂₀₁₀=1.599; 20 pkt. MNiSW**
5. J. Turło, B. Gutkowska, F. Herold, **M. Dawidowski**, T. Słowiński, A. Zobel *Relationship between selenium accumulation and mycelial cell composition in lentinula edodes (Berk.) cultures* **J. Toxicol. Env. Health, Part A** 73, (2010), 1211-1219; **IF₂₀₁₀=1.637; 25 pkt. MNiSW**

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Po otrzymaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych 2010 kontynuowałem pracę naukową w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Zachęcony przez wysoką aktywność przeciwdrgawkową pochodnych 2,6-diketopiperazyny oraz wyzwaniem z zakresu syntezy tego typu związków, zintensyfikowałem badania w tym kierunku. Efektem tych prac są rezultaty szczegółowo przedstawione w cyklu prac będących podstawą mojego wniosku o nadanie tytułu doktora habilitowanego. Prace te prowadziłem intensywnie w okresie czerwiec 2010 – marzec 2013.

Efektem kontynuowanej współpracy z *Anticovulsant Screening Program* było odkrycie związku ADD424042, o ciekawych właściwościach farmakologicznych. Związek ten,

pochodna α -pirydylo- α -fenyloacetamidu, wykazał silną i szeroką aktywność przeciwdrgawkową, będącą najprawdopodobniej wynikiem silnej (IC_{50} wyrażana w nM) inhibicji potencjałozależnych kanałów sodowych. Co ciekawe, mimo iż ADD424042 jest bliskim analogiem strukturalnym *Disopyramidu* (znanego leku przeciwaritmicznego z grupy blokerów kanału sodowego), nie powoduje on hipotensji ani zaburzeń w obrazie EKG u szczura (Disopiramid jest związkiem kardi toksycznym). Do tej pory uzyskano około 30 pochodnych ADD424042 i dalsza optymalizacja tego związku modelowego jest w toku.

W kwietniu 2013 rozpocząłem staż podoktorski w Institute of Structural Biology, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt oraz Lehrstuhl für Biomolekular NMR Spektroskopie, Department Chemie, Technische Universität München, pod kierunkiem Prof. Michaela Sattlera. Tematyka stażu jest multidyscyplinarna i dotyczy poszukiwania nowych inhibitorów interakcji międzybiałkowej Pex5-Pex14, jako związków aktywnych przeciw *Trypanosoma brucei*. Badania eksperymentalne obejmują przede wszystkim: ekspresję, oczyszczanie i krystalografię białek, projektowanie, syntezę chemiczną zaplanowanych związków oraz ich screening *in vitro* (2D NMR, *Fluorescence Polarization*, *AlphaScreenTM*). Innym, kierunkiem badań prowadzonych przeze mnie podczas stażu jest projektowanie oraz synteza nowych inhibitorów interakcji p53-MDM2/MDMX, o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów.

Korzystając z bogatego zaplecza aparaturowego Bawarskiego Centrum NMR prowadzę również badania NMR nad strukturą frakcji wielkocząsteczkowego Lentinanu, otrzymanej w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej WUM.

Część wyników wymienionych badań została szczegółowo opisana w następujących publikacjach naukowych:

1. J. Turło, B. Gutkowska, F. Herold, W. Gajzlerska, **M. Dawidowski**, A. Dorociak, A. Zobel *Biological availability and preliminary selenium speciation in selenium-enriched mycelium of Lentinula edodes (Berk.)* **Food Biotechnol.** 25, (2011), 16-29; **IF₂₀₁₁=0.520; 20 pkt. MNiSW**
2. F. Herold, A. Chodkowski, Ł. Izbecki, J. Turło, **M. Dawidowski**, J. Kleps, G. Nowak, K. Stachowicz, M. Dybała, A. Siwek, A. P. Mazurek, A. Mazurek, F. Pluciński *Novel*

- 4-aryl-pyrido[1,2-c]pyrimidines with dual SSRI and 5-HT1A activity. Part 3* **Eur. J. Med. Chem.** 46, (2011), 142-149; **IF₂₀₁₁= 3.346; 40 pkt. MNiSW**
3. T. Słowiński, J. Stefanowicz, **M. Dawidowski**, J. Kleps, S. Czuczwar, M. Andres-Mach, J. J. Łuszczki, G. Nowak, K. Stachowicz, B. Szewczyk, A. Sławińska, A. P. Mazurek, A. Mazurek, F. Pluciński, I. Wolska, F. Herold *Synthesis and biological investigation of potential atypical antipsychotics with a tropane core. Part 1* **Eur. J. Med. Chem.** 46, (2011), 4474–4488; **IF₂₀₁₁= 3.346; 40 pkt. MNiSW**
4. **M. Dawidowski***, F. Herold, A. Chodkowski, J. Kleps, P. Szulczyk, M. Wilczek *Synthesis And Anticonvulsant Activity Of Novel 2,6-Diketopiperazine Derivatives. Part 1: Perhydropyrrole[1,2-a]pyrazines* **Eur. J. Med. Chem.** 46, (2011), 4859-4869; **IF₂₀₁₁=3.346; 40 pkt. MNiSW**
5. **M. Dawidowski***, F. Herold, A. Chodkowski, J. Kleps *Synthesis And Anticonvulsant Activity Of Novel 2,6-Diketopiperazine Derivatives. Part 2: Perhydropyrido[1,2-a]pyrazines* **Eur. J. Med. Chem.** 47, (2012), 347-353; **IF₂₀₁₂=3.499; 40 pkt. MNiSW**
6. J. Turło, W. Gajzlerska, M. Klimaszewska, M. Król, **M. Dawidowski**, B. Gutkowska *Enhancement of tacrolimus productivity in Streptomyces tsukubaensis by the use of novel precursors for biosynthesis* **Enz. Microb. Technol.** 51, (2012), 388-395; **IF₂₀₁₁=2.592; 30 pkt. MNiSW**
7. K. Szwed, **M. Dawidowski**, M. Asztemborska *Enantiomeric separation of drugs using ion-interaction reagents in combination with β -cyclodextrin in HPLC* **Chromatographia** 76, (2013), 467-474; **IF₂₀₁₃=1.307; 20 pkt. MNiSW**
8. K. Szwed, **M. Dawidowski**, A. Bielejewska, M. Asztemborska *Optimization of enantioseparation of 2,6-diketopiperazine derivatives with β -cyclodextrin and hydroxy acids as components of mobile phase in liquid chromatography* **J. Liq. Chrom. Relat. Technol.** 36, (2013), 2580-2588; **IF₂₀₁₃=0.638; 15 pkt. MNiSW**

5.3 Liczbowe zestawienie całości dorobku

Liczba publikacji ogółem: **19**

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora: **5**

Po uzyskaniu stopnia doktora: **14**

Liczba komunikatów konferencjach oraz zjazdach naukowych: **6**

Sumaryczny Impact Factor według JCR, zgodnie z rokiem wydania: **43,146**

Sumaryczna punktacja wg MniSW: **508**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science, na dzień 12.01.2015: **5**

Liczba cytowań według bazy Web of Science, na dzień 12.01.2015: **64**

Bez autocytowań: **32**

5.4. Wykaz komunikatów zjazdowych

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora:

1. F. Herold, A. Chodkowski, Ł. Izbiński, M. Król, J. Kleps, J. Turło, G. Nowak, M. Dawidowski (2008) *Novel 4-aryl-5,6,7,8-tetrahydro-pyrido[1,2-c]pyrimidines with dual SSRI and 5-HT_{1A} activity*, XXth International Symposium on Medicinal Chemistry EFMC-ISMC, Wiedeń
2. F. Herold, J. Kleps, M. Wilczek, I. Wolska, J. Turło, A. Chodkowski, M. Dawidowski (2008) *The synthesis and molecular structure of all four optical isomers of 4-phenyl-perhydropyrido[1,2-a]pyrazine-1,3-dione*, XXIIIrd European Colloquium on Heterocyclic Chemistry, Antwerpia
3. F. Herold, M. Dawidowski, J. Kleps (2007) *Synteza nowych pochodnych 4-arylo-2H-pirydo[1,2-c]pirymidyny o spodziewanym działaniu na receptor 5-HT_{1A} oraz transporter serotoniny*, XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Katowice

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora:

1. M. Dawidowski, F. Herold, S. Sobczak, M. Wilczek, S. Zdanowski (2012) *Secondary amino-acids and ketones as coupling partners in Ugi U-5C-4CR multicomponent reaction. Optimization of conditions and application to synthesis of C-4 disubstituted 2,6-diketopiperazines*, V Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin
2. M. Dawidowski, F. Herold, A. Chodkowski, M. Wilczek (2011) *Application of Ugi (U-5C-4CR) multicomponent reaction as a key step in synthesis of 2,6-diketopiperazine derivatives with potential antiseizure activity in animal models of epilepsy*, IV Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin
3. M. Dawidowski, A. Chodkowski, M. Wilczek, J. Kleps, J. Turło, K. Szewczyk, F. Herold (2010) *Zastosowanie reakcji Ugi w syntezie nowych, chiralnych pochodnych 2,6-diketopiperazyny*, VII Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików, Warszawa

5.5. Nagrody naukowe

1. Zespołowa nagroda naukowa II stopnia przyznana w roku 2013 przez Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, za *współautorstwo cyklu publikacji dotyczących syntezy i biosyntezy związków o aktywności farmakologicznej*.
2. Zespołowa nagroda naukowa I stopnia przyznana w roku 2012 przez Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, za *osiągnięcia w zakresie syntezy nowych aktywnych na ośrodkowy układ nerwowy związków, pochodnych pirydopirymidyny, aminotropanu oraz diketopiperazyny*.
3. Indywidualna nagroda naukowa II stopnia przyznana przez Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w roku 2011 za *rozprawę doktorską pt. Synteza, struktura oraz potencjalne właściwości przeciwdrgawkowe nowych, chiralnych pochodnych 2,6-diketopiperazyny, wyróżnioną przez Radę Wydziału Farmaceutycznego jako praca summa cum laude*.
4. Zespołowa nagroda naukowa II stopnia przyznana w roku 2010 przez Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, za *badania związane z poszukiwaniami nowej generacji antydepresantów w grupie pochodnych pirydo[1,2-c]pirymidyny, związków o podwójnej wiązalności do receptorów 5-HT_{1A} oraz białka SERT*

5. Zespołowa Nagroda Naukowa III Stopnia przyznana w roku 2008 przez Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, za publikację *The synthesis of new diastereomers of (4S,8aS)- and (4R,8aS)-4-phenylperhydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,3-dione*.

5.6. Udział w projektach naukowych

1. „Pochodne kwasu 2-pirydylo-2-fenylooctowego jako nowa grupa związków o wysokiej aktywności przeciwdrgawkowej w zwierzęcych modelach epilepsji”. Projekt badawczy w ramach programu IUVENTUS PLUS (MNiSW), nr. rej. IP2012 008372; Okres realizacji projektu: 2013-2015; kierownik projektu
2. „Synteza nowych pochodnych perhydropirololo[1,2-a]pirazyny o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej w zwierzęcych modelach epilepsji”. Projekt badawczy w ramach programu IUVENTUS PLUS (MNiSW), nr. rej. IP2011-009071; Okres realizacji projektu: 2012-2014; kierownik projektu
3. „Synteza nowych, chiralnych pochodnych 2,6-diketopiperazyny, perhydropirololo[1,2-a]pirazyno-1,3-dionu oraz perhydropirydo[1,2-a]pirazyno-1,3-dionu o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym”. Grant MNiSzW nr. rej. NN405 623138; Okres realizacji projektu: 2010-2013; główny wykonawca
4. „Synteza nowych pochodnych 2,6-diketopiperazyny o spodziewanym działaniu przeciwdrgawkowym w zwierzęcych modelach epilepsji”. Badania własne w ramach projektu badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców (Warszawski Uniwersytet Medyczny); Okres realizacji projektu: 2011-2012; kierownik projektu
5. „Synteza nowych pochodnych pirydo[1,2-c]pirymidyny o aktywności przeciwdepresyjnej”. Grant MNiSzW nr. rej. NN405 065934; Okres realizacji projektu: 2009-2011; wykonawca

5.7. Autorstwo recenzji dla czasopismach naukowych

W latach 2011-2014 byłem autorem 35 recenzji artykułów naukowych dla następujących czasopism: Bioorganic and Medicinal Chemistry (5 prac), Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (2 prace), European Journal of Medicinal Chemistry (10 prac), Journal of

Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry (3 prace), Medicinal Chemistry Research (2 prace), Medicinal Chemistry (5 prac), Molecular Diversity (4 prac), Synthesis (1 praca), Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (1 praca), Drug, Healthcare and Patient Safety (1 praca), Przemysł Chemiczny (1 praca).

M. Dawydow